

ANÁLISIS CARIOTÍPICO Y DIFERENCIACIÓN DE CROMOSOMAS SEXUALES EN CUATRO ESPECIES DE *Anastrepha* (Diptera:Tephritidae)

KARYOTYPE ANALYSIS AND DIFFERENTIATION OF SEX CHROMOSOMES IN FOUR *Anastrepha* SPECIES (Diptera:Tephritidae)

Jorge Ibañez-Palacios¹, Armando García-Velazquez^{2*}, Cristina S. Zepeda-Cisneros¹, Tarsicio Corona-Torres²

¹Campaña Nacional Moscas de la Fruta. Acuerdo SAGARPA-IICA, Tapachula Chiapas.

²Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco México. (garciaiv@colpos.mx).

RESUMEN

El género *Anastrepha* Schiner, endémico en América tropical y subtropical, incluye a la especie *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* y *A. serpentina* que son polífagas y que parasitan una amplia gama de plantas. Estas especies se estudiaron por su amplia distribución geográfica y por parasitar a diferentes especies de frutas, para lo cual se usaron larvas de tercer estadio desarrolladas en el laboratorio del Programa Moscafrut en Metapa de Domínguez, estado de Chiapas, México. Se disectó el ganglio cerebral en solución acuosa de citrato de sodio 1 % (p/v) donde se mantuvo 20 min, se transfirió a metanol: ácido acético 3:1 (v/v), y se maceró en ácido acético 60 %. Una gota de este tejido en suspensión se colocó en un portaobjetos sobre una plancha caliente (45-50 °C). Se observó al microscopio (Zeiss Axioskop 40) con contraste de fases, seleccionando células con cromosomas dispersos. Se fotografiaron con una cámara AxioCam y software Axiovision 4.0 realizando mediciones con el programa Image Tool 3.0. El análisis se realizó con 20 células/sexo/especie. El centrómero fue observado sin pretratamiento. Se determinaron los cariotipos en: *A. ludens* ♀, 2n=12, Xg Xg+V_{II} telo, n. f. 12, ♂, 2n=12, Xg Yp+V_{II} Telo n. f. 12; *A. obliqua* ♀, 2n=12, Xg Xg+V_{II} Telo, n. f. 12, ♂, 2n=12, Xg Yg+V_{II} Telo n. f. 12; *A. striata* ♀, 2n=12, Xg Xg+II_{II} Meta+III_{II} Telo n. f. 16, ♂, 2n=12, Xg Yp+II_{II} Meta+II_{II} Telo n. f. 16; *A. serpentina* ♀, 2n=12, X₁ X₁ X₂ X₂+IV_{II} Meta n. f. 20, ♂, 2n=11 X₁ X₂, Yg+IV_{II} Meta n. f.22. Se propone que este grupo de especies presenta translocaciones Robertsonianas como mecanismo de especiación, a partir de *A. serpentina*.

Palabras clave: *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. striata*, *A. serpentina*, evolución, genomas, moscas de la fruta.

ABSTRACT

The genus *Anastrepha* Schiner, endemic to tropical and subtropical América, includes the species *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* and *A. serpentina*, which are polyphagous and parasite a wide range of plants. These species were studied because of their broad geographic distribution and because they parasite different fruit species. Larvae in their third stage reared in the laboratory of the Programa Moscafrut in Metapa de Domínguez, Chiapas, México, were used. The cerebral ganglia were dissected in an aqueous solution of 1 % (w/v) sodium citrate in which they were kept for 20 min, then transferred to methanol:acetic acid (3:1 (v/v) and macerated in 60 % acetic acid. One drop of this tissue suspension was placed on a slide on a hot plate (45-50 °C) and observed with a microscope (Zeiss Axioskop 40) with phase contrast, and the cells with disperse chromosomes were selected. These were photographed with an AxioCam camera and Axiovision 4.0 software, and measurements were taken with Image Tool 3.0. Twenty cells/sex/species were analyzed. The centromere was observed without pretreatment. Karyotypes were determined in each species: *A. ludens* ♀, 2n=12, Xg Xg+V_{II} telo, n. f. 12, ♂, 2n=12, Xg Yp+V_{II} Telo n. f. 12; *A. obliqua* ♀, 2n=12, Xg Xg+V_{II} Telo, n. f. 12, ♂, 2n=12, Xg Yg+V_{II} Telo n. f. 12; *A. striata* ♀, 2n=12, Xg Xg+II_{II} Meta+III_{II} Telo n. f. 16, ♂, 2n=12, Xg Yp+II_{II} Meta+II_{II} Telo n. f. 16; *A. serpentina* ♀, 2n=12, X₁ X₁ X₂ X₂+IV_{II} Meta n. f. 20, ♂, 2n=11 X₁ X₂, Yg+IV_{II} Meta n. f.22. It is proposed that this group of species has Robertsonian translocations as a speciation mechanism parting from *A. serpentina*.

Key words: *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. striata*, *A. serpentina*, evolution, genomes, fruit flies.

INTRODUCTION

In México, approximately 1 300 000 ha of fruit trees are cultivated, and their production is consumed fresh or processed, both domestically

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Septiembre, 2009. Aprobado: Mayo, 2010.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 691-700. 2010.

INTRODUCCIÓN

En México se cultivan aproximadamente 1 300 000 ha de árboles frutales y su producción se destina al consumo en fresco o procesado, tanto nacional como extranjero. Las moscas de la fruta del género *Anastrepha* son uno de los tres principales problemas de la fruticultura en México (Gutiérrez, 2005).

La detección de un espécimen en estado inmaduro de una mosca del género *Anastrepha* en las zonas libres de México debe considerarse un foco incipiente de expansión con repercusiones económicas en dicha zona. México establece tres zonas fitosanitarias en relación a la presencia de moscas de la fruta: 1) zona bajo control fitosanitario; 2) zona de baja prevalencia; 3) zona libre; y determina hacia donde pueden desplazarse los frutos producidos en el país. Los únicos frutos con movilización ilimitada en el mercado interno e internacional son los producidos en zonas libres de moscas. Los frutos producidos en una zona bajo control fitosanitario sólo pueden venderse localmente y no pueden exportarse (Gutiérrez, 2005).

En México, las moscas de la fruta consideradas de importancia económica son: 1) *A. ludens* identificada como problema de interés público por los daños a la fruticultura (Diario Oficial Dic. 13 de 1985), principalmente naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) con una dominancia de infestación en zonas bajas (menos de 500 m altitud); 2) *A. obliqua* ataca principalmente mango (*Mangifera indica*) localizado en zonas a más de 900 m y en ciruelas del género *Spondia*; 3) *A. striata* ataca sólo a guayaba (*Psidium guajava*); y 4) *A. serpentina* ataca una gran variedad de zapotes como el mamey (*Lucuma mammos*) y el chicozapote (*Manilkara sapota*) (Hernández-Ortiz, 1992).

El estudio taxonómico del género *Anastrepha* es complicado y la identificación de especies se basa principalmente en aspectos morfológicos, ya sea de huevos, larvas o adultos (Aluja, 1994; Norrbom *et al.*, 1999). Además se presentan problemas para determinar el estatus taxonómico de algunas especies de este género, por lo cual es necesario buscar medios alternativos. Los estudios citogenéticos, como las descripciones cariotípicas, son un valioso instrumento en aspectos filogenéticos y evolutivos de las especies.

and internationally. Fruit flies of the genus *Anastrepha* are one of the three main problems of fruit production in México (Gutiérrez, 2005).

Detection of one immature specimen of the genus *Anastrepha* in a fly-free zone of México should be considered an incipient focus of expansion with economic repercussions in that zone. México has established three phytosanitary zones according to the presence of fruit flies: 1) zone under control, 2) zone of low prevalence, 3) zone free of fruit flies. The direction in which fruit produced in the country might be shipped is also determined. The only fruits that are not limited in their mobilization on the domestic and international markets are those produced in fly-free zones. The fruits produced in a zone under phytosanitary control can be sold only locally and cannot be exported (Gutiérrez, 2005).

In México, the fruit flies that are considered of economic importance belong to four species. 1) *A. ludens*, identified as a problem of public interest because of the damage it causes to fruit production (Diario Oficial Dec. 13, 1985), mainly that of oranges (*Citrus sinensis*), tangerines (*Citrus reticulata*) and grapefruit (*Citrus paradisi*), with infestation dominance in low regions (below 500 m altitude); 2) *A. obliqua* attacks mainly mango (*Mangifera indica*) located in zones at altitudes above 900 m and plums of the genus *Spondia*; 3) *A. striata* attacks only guayaba (*Psidium guajava*); and 4) *A. serpentina* attacks a wide variety of sapote such as mamey (*Lucuma mammos*) and sapodilla (*Manilkara sapota*) (Hernández-Ortiz, 1992).

The taxonomic study of the genus *Anastrepha* is complicated and the species are identified mainly on the basis of morphological aspects (Aluja, 1994; Norrbom *et al.*, 1999). There are also problems in determining the taxonomic status of some of the species of this genus, and thus it is necessary to look for alternative methods. Cytogenetic research, such karyotypical descriptions, is a valuable instrument in the study of phylogenetic and evolutionary aspects of species.

The most frequent chromosome number in the genus *Anastrepha* is $2n=12$ (Selivon *et al.*, 2005), although there are differences in the number of long arms, or "nombre fundamental" (Bush, 1962) as well as in the mechanisms for sexual determination: there are species with the XY/XX mechanism and others, such as *A. bistrigata* and *A. serpentina*, that exhibit

El número cromosómico más frecuente en el género *Anastrepha* es $2n=12$ (Selivon *et al.*, 2005), aunque se presentan diferencias en el número de brazos mayores o nombre fundamental (Bush, 1962) así como en el mecanismo de determinación sexual; hay especies con mecanismo XY/XX, y otras como *A. bistrigata* y *A. serpentina* que exhiben heteromorfismo de los heterocromosomas que involucran $X_1X_2Y/X_1X_2X_2$ (Solferini y Morgante, 1987; Selivon *et al.*, 2005).

El análisis cromosómico de especies del género *Anastrepha* puede ayudar a entender la situación taxonómica y evolutiva de este grupo de moscas de la fruta, especialmente el estudio detallado del cariotipo en *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* y *A. serpentina*. La descripción de cariotipos y diferenciación de los cromosomas sexuales es importante para planear métodos de control de estas plagas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se usaron larvas en tercer estadio, criadas en laboratorio en Metapa de Domínguez, estado de Chiapas. Las especies *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* y *A. serpentina* se han mantenido por varias generaciones en laboratorio a 26 ± 2 °C y 70-80 % de humedad relativa.

Preparaciones citológicas

Para analizar cromosomas en metafase se usó el ganglio cerebral en larvas de tercer estadio con la técnica de secado al aire con tinción Giemsa (Ashburner, 1989). Se disecaron 20 larvas/sexo en solución acuosa 1 % (p/v) de citrato de sodio, donde se mantuvieron 20 min, se transfirieron a metanol: ácido acético (3:1 v/v) por 2 min y se sumergieron en ácido acético 60 % para disgregar las células. Con una pipeta se depositó una gota de suspensión de células en un portaobjetos sobre una plancha térmica a 45-50 °C, se coloreó con Giemsa 5 % en amortiguador de fosfato 0.01M (p/v) y se observó en contraste de fases (Ashburner, 1989).

De cada especie se estudiaron 20 células/20 larvas/sexo, en total 400 células. Las preparaciones se analizaron en un microscopio Carl Zeiss, Axioskop 40. Se seleccionaron células dispersas con cromosomas separados y se capturaron independientemente con una cámara AxioCam HRm y software Axiovision 4.0, realizando las mediciones con el programa ImageTool 3.0.

heteromorphism of the heterochromosomes that involve $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ (Solferini and Morgante, 1987; Selivon *et al.*, 2005).

Chromosome analysis of species of the genus *Anastrepha* can help to understand the taxonomic and evolutionary situation of this group of fruit flies, especially the detailed study of karyotypes in *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* and *A. serpentina*. The description of karyotypes and sex chromosome differentiation is important in planning methods of control of these pests.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Third stage larvae reared in the laboratory in Metapa de Domínguez, state of Chiapas were used. The species *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* and *A. serpentina* had been maintained for several generations in the laboratory at 26 ± 2 °C and 70-80 % relative humidity.

Cytological preparations

The cerebral ganglion of third stage larvae was used to analyze chromosomes in metaphase with the technique of air drying with Giemsa dye (Ashburner, 1989). Twenty larvae/sex were dissected in a 1 % (w/v) aqueous solution of sodium citrate in which they were kept for 20 min. They were then transferred to methanol:acetic acid (3:1 v/v) for 2 min and submerged in 60 % acetic acid to disintegrate the cells. With a pipette, a drop of the cell suspension was deposited on a slide over a heating plate (45-50 °C) and tinted with Giemsa 5 % in a 0.01 M (w/v) phosphate buffer to observe phase contrasts (Ashburner, 1989).

Of each species, 20 cells/20 larvae/sex were studied for a total of 400 cells. The preparations were analyzed under a Carl Zeiss, Axioskop 40 microscope and individually photographed with an AxioCam HRm camera and Axiovision 4.0 software and measured with Image Tool 3.0.

Arm length and total length of each chromosome were determined for each species. With these data the total length of the genome, relative size (L %) and arm ratio (r, or I/C) of each chromosome were calculated. The idiogram for each species was constructed following the system described by García (2001).

RESULTS AND DISCUSSION

The four *Anastrepha* species in this study exhibited chromosome polymorphism in

De cada especie se determinó longitud de brazos y longitud total de cada cromosoma. Con estos datos se calculó longitud total del genoma, tamaño relativo (L %) y relación de brazos (r , ó I/C) de cada cromosoma. Se elaboró el idiograma para cada especie con base al sistema descrito por García (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cuatro especies de *Anastrepha* en este estudio exhibieron polimorfismo cromosómico en autosomas y heterocromosomas en número y tamaño, así como en el número de brazos mayores o nombre fundamental (n.f.), concepto referido por Jones (1976) al número de brazos mayores: un cromosoma metacéntrico o submetacéntrico se considera que es n.f.=2 y un cromosoma acrocéntrico o telocéntrico n.f.=1.

La numeración a los pares cromosómicos se estableció asignando el par I a los cromosomas sexuales (Zacharopoulou, 1986).

Anastrepha ludens

Los cromosomas somáticos son pequeños con ligeras diferencias entre machos y hembras. El cromosoma X es mayor que el Y, los autosomas presentan un orden decreciente (Figura 5): II es el más grande (8.38 μm) y el par VI el más pequeño (4.32 μm) (Cuadro 1). El heterocromosoma Y en *A. ludens* es junto con el Y de *A. striata* el cromosoma más pequeño (1.26 μm y 0.93 μm) (Figura 5; Cuadro 1). Estas dimensiones concuerdan con lo observado por García y Bárcenas (1983).

La longitud del genomio de esta especie es el segundo más grande de las cuatro especies estudiadas; menor que *A. serpentina* (38.0 μm , 48.0 μm).

Los seis pares de cromosomas son telocéntricos (2n=12). Bush (1962) y García y Bárcenas (1983) los describen como acrocéntricos; en este estudio no se observó el brazo corto. Los cromosomas sexuales (Figura 1) son altamente heterocromáticos y el X presenta un extremo oscuro; la separación de cromátidas hermanas es retrasada respecto a los otros cromosomas.

Anastrepha obliqua

El cariotipo de *A. obliqua* presenta dimensiones semejantes a *A. ludens* (Figura 5; Cuadro 1).

autosomas and heterochromosomes in number and size, as well as in number of long arms, or nombre fundamental (n.f.), a concept used by Jones (1976) to refer to the number of long arms: a metacentric or submetacentric chromosome is considered to have n.f.=2, and an acrocentric or telocentric chromosome has n.f.=1.

Numbering of chromosome pairs was established by designating sex chromosomes as pair I (Zacharopoulou, 1986).

Anastrepha ludens

The somatic chromosomes are small with slight differences between males and females. The X chromosome is larger than the Y chromosomes, and the autosomes are ordered by decreasing size (Figure 5), the largest (8.38 μm) being II and the smallest (4.32 μm) pair VI (Table 1). The heterochromosome Y in *A. ludens*, together with the Y chromosome of *A. striata*, is the smallest (1.26 μm and 0.93 μm) (Figure 5; Table 1). These dimensions coincide with those observed by García and Bárcenas (1983).

The length of the genome of *A. ludens* is the second longest of the four species studied, following *A. serpentina* (38.0 μm , 48.0 μm).

The six pairs of chromosomes are telocentric (2n=12) Bush (1962) and García and Bárcenas (1982) describe them as acrocentric. In our study, the short arm was not observed. The sex chromosomes (Figure 1) are highly heterochromatic; moreover, the X chromosome exhibits a dark tip and the separation of sister chromatids is delayed, relative to the rest of the chromosomes.

Anastrepha obliqua

The *A. obliqua* karyotype has dimensions similar to those of *A. ludens* (Figure 5; Table 1). The X chromosome of the two species differs in terms of the presence of a small short arm, and the Y chromosome of *A. obliqua* is significantly longer (4.49 μm) than those of *A. ludens* (1.26 μm) and *A. striata* (0.93 μm). This heterochromosome was the second longest of the species studied, while the longest was observed in *A. serpentina* (8.23 μm). The female of this species had the shortest total genome length found in this study: 27.8 μm vs 40.5 μm in *A. serpentina*.

Cuadro 1. Cariotipos de cuatro especies de *Anastrepha*, dimensiones promedio, desviación estándar (μm) y nombre fundamental (n.f.).
 Table 1. Karyotypes of four species of *Anastrepha*, average dimensions, standard deviation (μm), and nombre fundamental (n.f.).

Especie	Sexo	Heterocromosomas (μm)						Autosomas (μm)						Dimensión genómica total (μm)	n.f.	
		X	X ₁	X ₂	Y	II	III	IV	V	VI	VI	VI				
<i>A. ludens</i>	♂	5.75 _t ±1.7			1.26 _t ±0.3	8.38 _t ±1.8	6.45 _t ±1.0	5.91 _t ±1.1	5.43 _t ±0.5	4.83 _t ±1.0					38.0	12
	♀	5.13 _t ±1.4				8.02 _t ±1.2	6.40 _t ±1.2	5.75 _t ±0.9	5.23 _t ±0.8	4.65 _t ±0.9					35.2	12
<i>A. obliqua</i>	♂	5.37 _t ±0.8			4.49 _t ±1.8	6.88 _t ±0.7	5.79 _t ±0.7	5.36 _t ±0.9	4.96 _t ±0.7	4.51 _t ±0.9					37.3	12
	♀	4.13 _t ±1.6				6.24 _t ±0.9	4.94 _t ±0.5	4.50 _t ±0.6	4.19 _t ±0.7	3.81 _t ±0.7					27.8	12
<i>A. striata</i>	♂	5.57 _t ±0.5			0.93 _t ±1.8	7.13 _t ±0.8	4.98 _t ±0.3	5.87 _t ±0.8	5.22 _t ±0.7	4.70 _t ±0.8					34.4	16
	♀	5.19 _t ±0.2				6.64 _t ±0.3	4.71 _t ±0.3	5.30 _t ±0.3	4.90 _t ±0.4	4.58 _t ±0.2					31.3	16
<i>A. serpentina</i>	♂		5.44 _t ±1.9	6.16 _t ±1.7	8.23 _t ±1.7	8.83 _t ±2.6	7.39 _t ±2.9	6.27 _t ±0.2	5.83 _t ±2.0					48.2	19	
	♀		5.16 _t ±0.9	7.00 _t ±1.5		8.95 _t ±1.8	7.02 _t ±1.2	6.46 _t ±0.2	5.84 _t ±1.0					40.5	20	

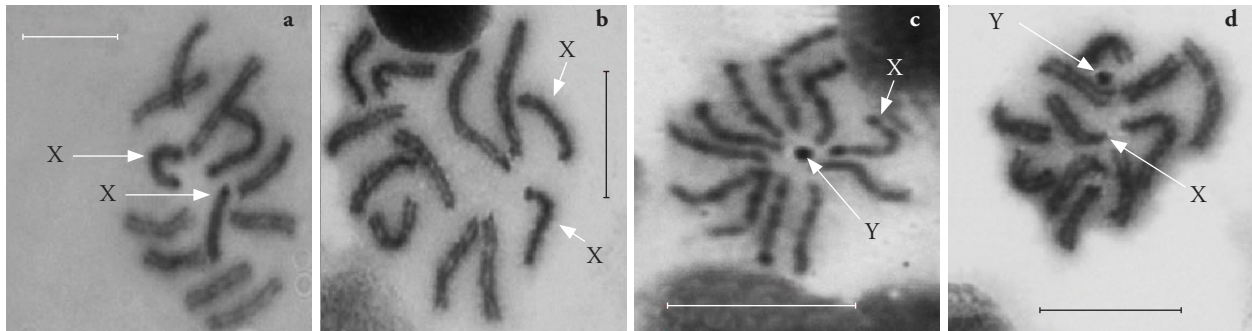


Figura 1. Metafase mitótica *A. ludens* hembra (a, b) (XX) y macho (c, d) (XY) (escala = 10 μ m).
Figure 1. Mitotic metaphase *A. ludens* female (a, b) (XX) and male (c, d) (XY) (scale = 10 μ m).

El cromosoma X en ambas especies difiere en la presencia de un pequeño brazo corto y el cromosoma Y de *A. obliqua* es significativamente mayor (4.49 μ m) que el de *A. ludens* (1.26 μ m) y que *A. striata* (0.93 μ m). Este heterocromosoma es el segundo más grande en las especies estudiadas; el más grande se observa en *A. serpentina* (8.23 μ m). La hembra de esta especie tuvo el más corto genoma total en este estudio: 27.8 μ m vs. 40.5 μ m en *A. serpentina*.

Anastrepha striata

Esta especie presenta un número cromosómico de $2n=12$. A diferencia de *A. ludens* y *A. obliqua* tiene un cariotipo asimétrico con los cromosomas II y III metacéntricos y el resto telocéntricos. La longitud del par autosómico III (Figura 5) es ligeramente menor que el de *A. obliqua* y *A. ludens* (4.98 μ m vs. 5.79 μ m y 6.45 μ m) (Cuadro 1). El par III también se identifica por una constricción secundaria característica en uno de los brazos (Figura 3). El mecanismo de determinación sexual es el mismo de *A. ludens* y *A. obliqua* XY/XX, pero el

Anastrepha striata

This species has a chromosome number of $2n=12$. Unlike *A. ludens* and *A. obliqua*, it has an asymmetric karyotype with metacentric chromosomes II and III, and the rest are telocentric. The length of the autosome pair III (Figure 5) is slightly shorter than that found in *A. obliqua* and *A. ludens* (4.98 μ m vs. 5.79 μ m and 6.45 μ m) (Table 1). Pair III is also identified by a secondary constriction as a characteristic of one of the arms (Figure 3). The sex determination mechanism is the same as that of *A. ludens* and *A. obliqua* XY/XX, but the Y chromosome is as small as that in *A. ludens* (Table 1).

Anastrepha serpentina

This species has the largest Y chromosome (8.23 μ m, Table 1) of the four species of this study, and a like tendency is observed in X_1 and X_2 with respect to the X chromosomes of *A. ludens*, *A. obliqua* and *A. striata*. Also, autosomes II, III, IV and V are metacentric, according to the classification of

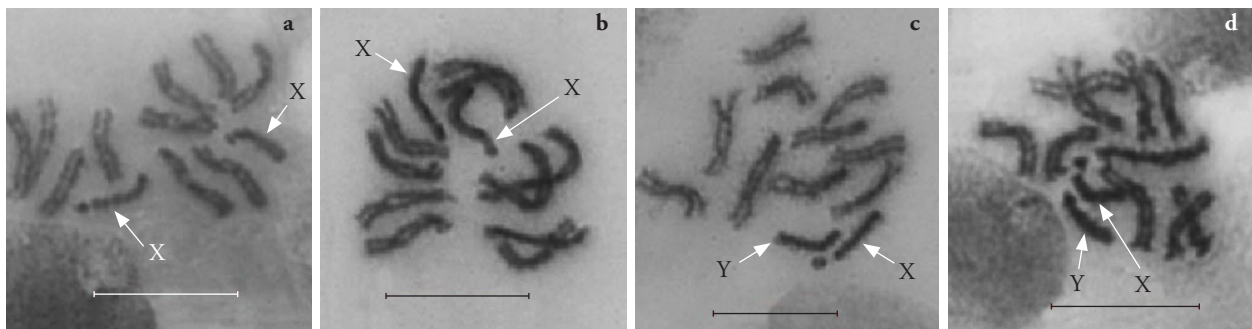


Figura 2. Metafase mitótica *A. obliqua* hembra (a, b) (XX) y macho (c, d) (escala = 10 μ m).
Figure 2. Mitotic metaphase *A. obliqua* female (a, b) (XX) and male (c, d) (scale = 10 μ m).

cromosoma Y es tan pequeño como en *A. ludens* (Cuadro 1).

Anastrepha serpentina

Esta especie presenta el cromosoma Y de mayor tamaño ($8.23 \mu\text{m}$, Cuadro 1) de las especies de este estudio, e igual tendencia se observó en el X_1 y X_2 con respecto a los cromosomas X de *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. striata*. Además los autosomas II, III, IV y V son metacéntricos, de acuerdo a la clasificación de Levan *et al.* (1964) y más grandes que en las otras especies estudiadas (Cuadro 1; Figura 5). Estos cinco autosomas metacéntricos influyen en aumentar la longitud total del genoma de esta especie. Las dimensiones de los genomas son $27.8 \mu\text{m}$ en hembras y $37.3 \mu\text{m}$ en machos en *A. obliqua* y las mayores son en *A. serpentina* ($40.5 \mu\text{m}$ hembras y $48.2 \mu\text{m}$ machos), lo que constituye diferencias significativas entre estos genomas (Cuadro 1).

Los cromosomas X en hembras son dos de tamaño diferentes X_1 , X_1 y X_2 , X_2 y en los machos X_1X_2Y . Los cromosomas X_1 y X_2 son telocéntricos altamente heterocromáticos. Los X_1 miden $5.44 \mu\text{m}$, los X_2 son ligeramente más grandes ($6.16 \mu\text{m}$; Figura 4). Otra característica que ayuda a diferenciar ambos pares de cromosomas es la presencia de un bloque heterocromático terminal en los X_2 , pero ausente en los X_1 (Figura 4).

El cromosoma Y se reconoce porque es más largo en el genoma ($8.23 \mu\text{m}$; Cuadro 1) y presenta una constricción centromérica. La identificación de los cromosomas sexuales se basó en el apareamiento somático, o asociación secundaria.

Levan *et al.* (1964), and larger than those found in the other species studied (Table 1; Figure 5). These five metacentric autosomes have an influence in increasing the total length of the genome of this species. The largest dimensions of the genome are those of *A. serpentina* ($40.5 \mu\text{m}$ in females and $48.2 \mu\text{m}$ in males), while those of *A. obliqua* are $27.8 \mu\text{m}$ females and $37.3 \mu\text{m}$ males (Table 1). These dimensions constitute significant differences between these genomes.

The X chromosomes in females are of two different sizes X_1 , X_1 and X_2 , X_2 , and in males X_1X_2Y . The X_1 and X_2 chromosomes are telocentric and highly heterochromatic. The X_1 measure $5.44 \mu\text{m}$ and the X_2 are slightly larger ($6.16 \mu\text{m}$; Figure 4). Another characteristic that helps to distinguish the two pairs of chromosomes is a heterochromatic terminal block present in the X_2 , but absent in the X_1 (Figure 4).

The Y chromosome is recognizable because it is the longest of the genome ($8.23 \mu\text{m}$; Table 1), and it has a centromere constriction. Identification of the sex chromosomes was based on somatic pairing, or secondary association.

Comparative analysis of karyotypic evolution in the four species of *Anastrepha*

The species *A. ludens*, *A. striata*, *A. obliqua* and *A. serpentina* have the most frequent chromosome numbers of the order Diptera (Bush, 1962; White, 1969). *A. ludens* and *A. obliqua* belong to the fraterculus group, and similar characteristics are present in their karyotype. Both species have n.f. 12 in females and 14 in males and X/Y chromosomes,

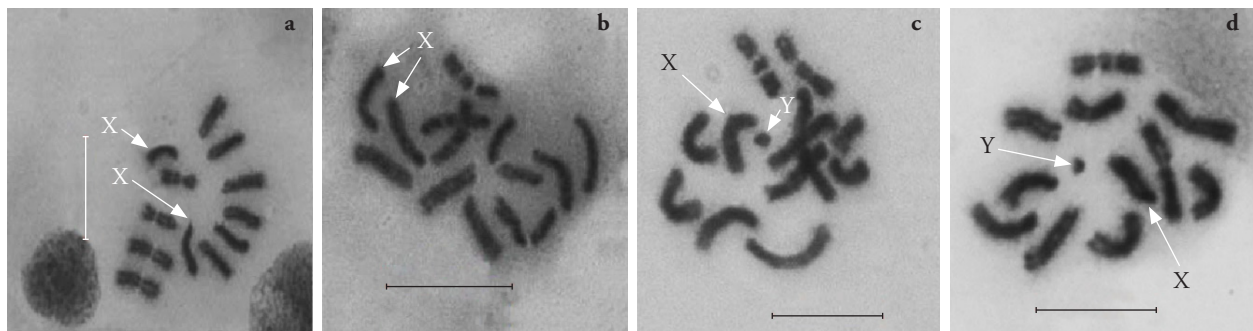


Figura 3. Metafases mitóticas de *A. striata* hembra (a, b) (XX) y macho (c, d) (XY). Cromosoma III mostrando constricción secundaria (escala = $10 \mu\text{m}$).

Figure 3. Mitotic metaphase *A. striata* female (a, b) (XX) and male (c,d) (XY). Chromosome III exhibiting secondary constriction (scale = $10 \mu\text{m}$).

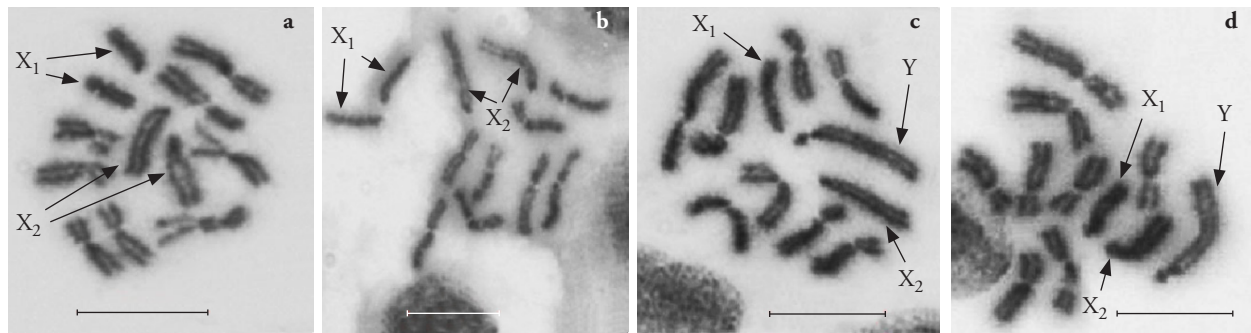


Figura 4. Metafase mitótica de *A. serpentina* hembra (a, b) (X_1 , X_1 y X_2 , X_2); macho (c, d) 3 cromosomas sexuales heteromórficos (X_1 , X_2 y Y) (escala = $10 \mu\text{m}$).

Figure 4. Mitotic metaphase *A. serpentina* female (a, b) (X_1X_1 and X_2 , X_2) and male (c, d) 3 heteromorphic sex chromosomes (X_1 , X_2 and Y) (scale = $10 \mu\text{m}$).

Análisis comparativo de la evolución cariotípica en las cuatro especies de *Anastrepha*

Las especies *A. ludens*, *A. striata*, *A. obliqua* y *A. serpentina* tienen los números cromosómicos más frecuentes en el orden Díptera (Bush, 1962; White, 1969). *A. ludens* y *A. obliqua* pertenecen al grupo fraterculus y presentan características similares en su cariotipo. Ambas especies tienen un n.f. 12 en hembras y 14 en machos y cromosomas X/Y, aunque el Y de *A. obliqua* ($4.49 \mu\text{m}$) es mayor que el de *A. ludens* ($1.26 \mu\text{m}$).

Las otras dos especies estudiadas pertenecientes al grupo striata (*A. striata*) y al grupo serpentina (*A. serpentina*) presentaron un n.f. mayor: para la primera 16 y 19 y para la segunda; n.f. 20 en hembras y 22 en machos (Cuadro 1).

El número y tamaño de los heterocromosomas de *A. serpentina* y *A. striata* (Figura 5) presenta un cambio en estructura: los autosomas en *A. ludens* y *A. obliqua* son telocéntricos mientras que los cariotipos de *A. serpentina* y *A. striata* cuatro y dos son metacéntricos.

De tales cariotipos se puede considerar que en estas cuatro especies de *Anastrepha* han ocurrido fusiones-fisiones Robertsonianas que han ocasionado un rearrreglo en el genoma de estas especies. Los centromeros no se originan *de novo*; por tanto, no es factible que *A. ludens*, *A. obliqua* o *A. striata* generaron el cariotipo de *A. serpentina*.

La evidencia que apoya esta hipótesis se encontró al comparar la longitud total del cromosoma Y de las cuatro especies: de grandes dimensiones en *A. serpentina* pero muy pequeño en *A. ludens*. En

although the Y chromosome of *A. obliqua* ($4.49 \mu\text{m}$) is longer than that of *A. ludens* ($1.26 \mu\text{m}$).

The other two species belonging to the striata group (*A. striata*) and the serpentina group (*A. serpentina*) have a larger n.f.: 16 in the first and 19 in the second; n.f. 20 for females and 22 for males (Table 1).

The number and size of the heterochromosomes of *A. serpentina* and *A. striata* (Figure 5) exhibit a change in structure: the autosomes in *A. ludens* and *A. obliqua* are telocentric, while the karyotypes four and two of *A. serpentina* and *A. striata* are metacentric.

Of these karyotypes, it can be assumed that in these four species of *Anastrepha* Robertsonian fusions have occurred and caused a rearrangement in the genome of these species. The centromeres do not originate *de novo*, and therefore it is not feasible that *A. ludens*, *A. obliqua* or *A. striata* generated the karyotype of *A. serpentina*.

Evidence that supports this hypothesis was found in the comparison of the total length of the Y chromosome of the four species studied: large dimensions in *A. serpentina*, but very small in *A. ludens*. In general, the reduction in the size of the Y chromosome has been identified as an evolutionary trend of this species (Rennie, 1993). This chromosomal evidence suggests that *A. serpentina* might be the ancestral form. More evidence comes from molecular systematics using the nuclear gene *period* with which was constructed the phylogenetic tree that presents serpentina as the ancestral group to the fraterculus and striata groups (Barr *et al.*, 2005). Based on the total lengths of the genome, it is observed that *A. serpentina* is that which has the

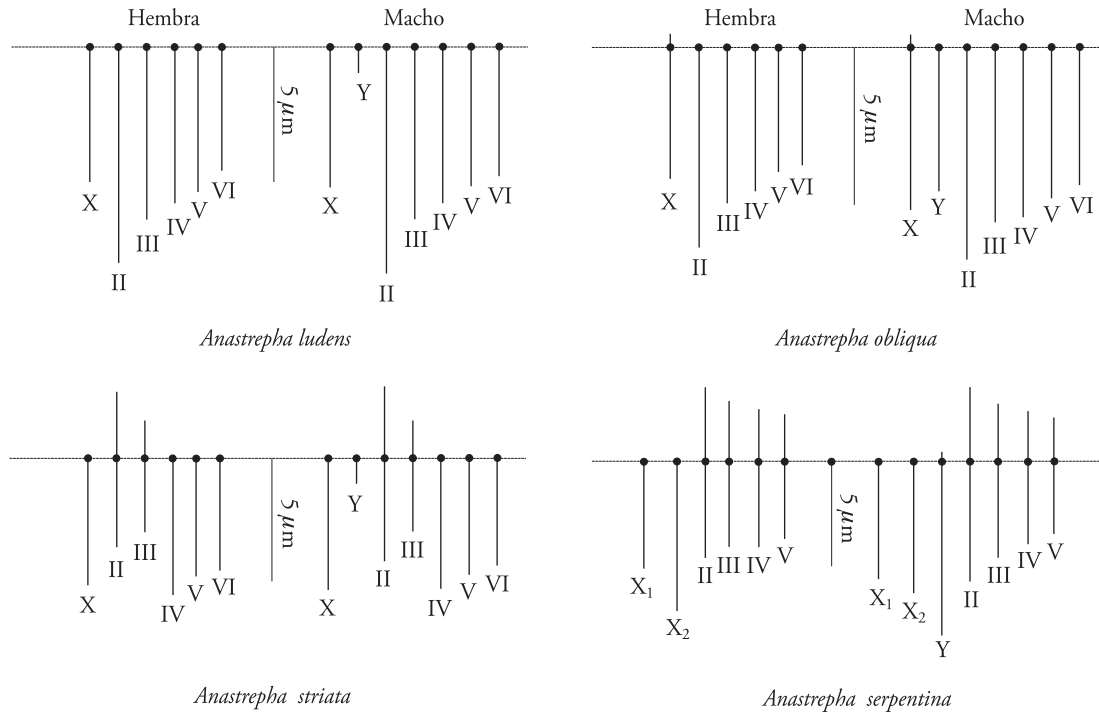


Figura 5. Idiograma de las cuatro especies de *Anastrepha* en estudio.

Figure 5. Idiogram of the four *Anastrepha* species studied.

general la reducción de tamaño del cromosoma Y se ha identificado como su tendencia evolutiva (Rennie, 1993). Esta situación cromosómica sugiere que *A. serpentina* podría ser la forma ancestral. Hay más evidencia al usar sistemática molecular mediante el gen nuclear *period*, con base en el cual se construyó el árbol filogenético que presenta al grupo *serpentina* como ancestral al grupo *fraterculus* y *striata* (Barr *et al.*, 2005). Con base a las longitudes totales del genoma se observa que *A. serpentina* presenta el parámetro de mayor magnitud respecto a las cuatro especies estudiadas, indicando que el proceso evolutivo en este género conlleva la pérdida de material genético (Cuadro 1).

Según Bush (1962), la presencia de un mecanismo $X_1X_1X_2X_2y$ de determinación sexual de *A. serpentina* constituye un caso muy esporádico en Dípteros. Esta característica sólo la comparte con *A. bistrigata* (Solferini y Morgante, 1987). Dobzhanky (1970) indica que este cariotipo es un caso de no-disyunción. Sin embargo, no se conoce la meiosis en tales machos para detectar el comportamiento de supuestos trivalentes de X_1YX_2 .

Desde el punto de vista evolutivo, al tener en *A. serpentina* un mayor número de brazos mayores (n.f.)

largest magnitude of this parameter among the four species studied, indicating that the evolutionary process of this genus involves loss of genetic material (Table 1).

According to Bush (1962), the presence of an $X_1X_1X_2X_2y$ mechanism for sexual determination of *A. serpentina* constitutes a case that is very sporadic in Dípteros. It is a characteristic known to be shared only with *A. bistrigata* (Solferini and Morgante, 1987). Dobzhanky (1970) indicates that this karyotype is a case of non-disjunction. However, the meiosis in these males is not well-enough known to detect the behavior of assumed X_1YX_2 trivalents.

From an evolutionary perspective, the fact that there is a larger number of long arms (n.f.) in *A. serpentina* than in the other species, suggests that it is an ancestral form that gave rise to other karyotypes through Robertsonian translocations.

CONCLUSIONS

The four species of fruit flies studied (*Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* and *A. serpentina*) and characterized chromosomally exhibited Robertsonian systems of fusion-fission, which

que en las especies restantes puede suponerse que es la forma ancestral que mediante translocaciones Robertsonianas dio lugar a los otros cariotipos.

CONCLUSIONES

Las cuatro especies de moscas de la fruta estudiadas (*Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* y *A. serpentina*) y caracterizadas cromosómicamente presentaron sistemas Robertsonianos de fusiones-fisiones que tuvieron efecto en el número cromosómico (2n) y el nombre fundamental (n.f.) en autosomas y heterocromosomas. Se considera que *A. serpentina* dio lugar a los restantes cariotipos de *Anastrepha*: *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. striata*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a La Campaña Nacional Moscas de la Fruta, DGSV SAGARPA-IICA, por haber permitido la realización de este trabajo en el Laboratorio de Sexado Genético, Metapa de Domínguez, Chiapas (México).

LITERATURA CITADA

Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 155-178.
 Ashburner, M. 1989. *Drosophila*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 433 p.
 Barr, N. B., L. Cui, and B. A. McPherson. 2005. Molecular systematics of the nuclear gene period in genus *Anastrepha* (Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98(2): 173-180.
 Bush, G. L. 1962. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha* (Tephritidae, Diptera). *Psyche* 69: 87-101.
 Dobzhansky, T. 1970. *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York & London. 505 p.
 García-Velazquez, A., y N. M. Bárcenas O. 1983. Cariotipo y mecanismos de determinación sexual en *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Agrociencia* 52: 95-100.
 García-Velazquez, A. 2001. Two desynaptic mutants of *Rhoeo spathacea* (Commelinaceae). *Citologia* 66: 269-274.

affected the chromosome number (2n) and the nombre fundamental (n.f.) in autosomes and heterochromosomes. It is assumed that *A. serpentina* gave rise to the other karyotypes of *Anastrepha*: *A. ludens*, *A. obliqua* and *A. striata*.

—End of the English version—



Gutiérrez R., J. M. 2005. Campaña Mexicana Contra Moscas de la Fruta: Situación Actual y Perspectivas. *In: Memoria del XVI Curso Internacional Sobre Moscas de la Fruta*. 26 Septiembre-14 Octubre. Metapa de Domínguez, Chiapas, México. pp: 7-10.
 Hernández-Ortiz, V. 1992. El género *Anastrepha* Schiner en México. (Diptera: Tephritidae). Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes. Instituto de Ecología Publicación No. 33 Xalapa Veracruz. 162 p.
 Jones, K. 1976. Multiple Robertsonian fusions in the evolution of plant genes. *In: K. Jones, and P. E. Brandham* (eds). *Current Chromosome Research*. Elsevier/North Holland Amsterdam. pp: 220-221.
 Levan, A., K. Fredga, and A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
 Norrbom, A. L., R. A. Zucchi, and V. Hernández-Ortiz. 1999. Phylogeny of the genera *Anastrepha* y *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology. *In: Aluja M., y A. L. Norrbom* (eds). *Fruit flies (Tephritidae) Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press. USA. pp: 299-342.
 Rennie J. 1993. How many genes and Y. Gene mappers find plenty, even in "junk" chromosomes. *Sci Am.* 268(1): 16-7, 20.
 Selivon, D. A., L. P. Perondini, and L. S. Rocha. 2005. Karyotype characterization of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae). *Neotropical Entomol.* 34(2): 273-279.
 Solferini, V. N., and J. S. Morgante. 1987. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Caryologia* 40: 229-241.
 White, M. J. D. 1969. Chromosomal rearrangement and speciation. *Ann. Rev. Genet.* 3: 75-98.
 Zacharopoulou, A. 1986. Cytogenetic analysis of mitotic and salivary gland chromosomes in the medfly *Ceratitis capitata*. *Genome* 29: 67-71.